

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26709064

研究課題名(和文)3Dイメージングセルソーティング法の開発

研究課題名(英文)Development of 3D Imaging Cell Sorting Method

研究代表者

杉浦 慎治(Shinji, Sugiura)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・上級主任研究員

研究者番号：10399496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：フローサイトメーター等の従来の細胞分離法では、表面抗原をマーカーとして細胞を分離する。一方、がん組織や幹細胞培養系などのヘテロな細胞集団の中にはマーカーの定まっていない細胞も多く、細胞の機能を細胞毎に個別に解析して細胞を分離する手法の開発が期待されている。本研究では、研究開発代表者の杉浦らが開発した光分解性ゲルを用いて三次元培養下での細胞形態と機能を指標として細胞を分離する「3Dイメージングセルソーティング法」を開発した。

研究成果の概要(英文)：In a conventional cell separation method such as a flow cytometer, cells are separated using a surface antigen as a marker. On the other hand, the markers for many heterogeneous cell populations such as cancer tissues and stem cell culture systems have been undefined yet, and it is expected to develop a method for separating cells by separately analyzing cell functions for each cell. In this study, we developed the "3D imaging cell sorting method" which separates cells using the photodegradable hydrogel using cell morphology as an indicator for cellular function under three dimensional culture.

研究分野：工学

キーワード：細胞分離 ハイドロゲル 癌 細胞培養 包埋培養 画像解析

1. 研究開始当初の背景

フローサイトメーター等の従来の細胞分離法では、表面抗原をマーカーとして細胞を分離する。一方、がん組織や幹細胞培養系などのヘテロな細胞集団の中にはマーカーの定まっていない細胞も多く、細胞の機能を細胞毎に個別に解析して細胞を分離する手法の開発が期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、研究開発代表者の杉浦らが開発した光分解性ゲルを用いて三次元培養下での細胞形態と機能を指標として細胞を分離する「3D イメージングセルソーティング法」を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、新規細胞分離手法として、以下のプロセスによって構成させる細胞分離方法を確立した。

- (i)光分解性ゲル内にごん細胞を包埋培養。
- (ii)三次元培養下での細胞形態や浸潤能を画像処理によって評価。
- (iii)局所光照射により標的細胞周囲のゲルを分解し、標的細胞を選択的に分離。

細胞分離のモデルケースとして、正常細胞とがん細胞の混合培養系から、浸潤能を有するがん細胞の選択的分離が可能であることを実証した。研究期間内に、細胞の生存率、各プロセスの細胞毒性、分離効率等の観点に関する定量評価までを実施した。

4. 研究成果

H26 年度はクリック架橋型の光開裂性架橋剤を合成し、その評価を進めた(図1)。

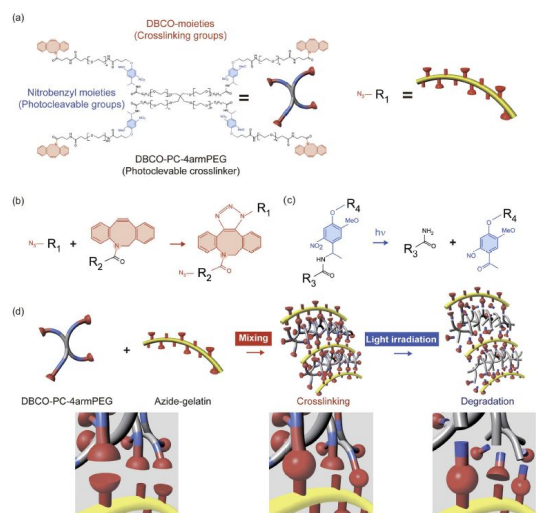


図1. クリック架橋型の光開裂性架橋剤。(a) クリック架橋型光開裂性架橋剤とアジドゼラチンの分子構造。(b) クリック架橋型光開裂性架橋剤とアジドゼラチンとの反応による架橋形成。(c) 光照射による光開裂反応。(d) クリック架橋型光開裂性架橋剤とアジドゼラチンとの反応によるゲル形成と光照射によるゲルの光分解の模式図。

その結果、細胞の生存率を保ったまま、細胞を光分解性ゲルに内包でき、その光分解性ゲルをマイクロパターン光照射により分解できることが示された(図2)。

LIVE DEAD (merge)

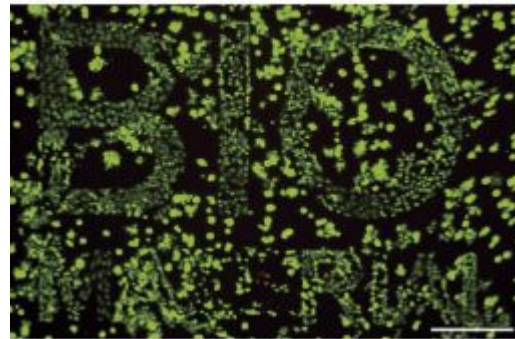


図2. 細胞を包埋した光分解性ゲルのマイクロパターン分解。スケールバーは200 μm。

H27 年度は、細胞分離の分離精度を検討するため、前年度に開発したクリック架橋型光開裂性架橋剤を用いて、正常細胞とがん細胞の混合培養系からの細胞分離を試みた。がん細胞の浸潤能を指標として細胞分離を行うための分離プロトコルについて検討した。この際に、筑波大学の臨床医学系の松井講師の開発した正常細胞・がん細胞共培養系をモデル培養系として分離プロトコルの開発を行った。この共培養系では、正常細胞とがん細胞で異なる蛍光発現ベクターを遺伝子導入し、蛍光観察により正常細胞(緑:RGM-GFP)とがん細胞(赤:RGK-KO)を容易に判別できるようになっている。精度の高い細胞分離を実現するためには、光照射条件の検討以外に、ゲルが溶解した領域からの細胞を回収するためのピペッティング精度が重要であることが判明した。

H28 年度は上述の光分解性ゲルを用いてマウス乳癌由来の細胞株の分離を行った。光分解性ゲル内の細胞形態に基づいて分離し、コロニー状の細胞と粒状の細胞とを取得した。取得したコロニー状の細胞と粒状の細胞の腫瘍形成能や転移の過多を検討したところ、それぞれの細胞が異なる性質を示した。以上の結果は本研究の細胞分離法の有効性を示す結果と考えられる。

H29 年度は細胞分離性能の定量的評価と蛍光イメージング法と組み合わせた細胞分離を推進した。細胞分離効率に関しては、光分解性ゲルへの包埋プロトコルと光照射、ピペッティング回収プロトコルを最適化し、好適な条件においては90%以上の成功率で目的細胞のみを単離するプロセスを確立した。蛍光イメージングに基づく細胞分離に関しては、赤色蛍光タンパク質遺伝子を導入した乳癌細胞(MCF7-RFP)をモデル細胞として使用し、蛍光陽性率の高い細胞を蛍光イメージングに基づいて識別し、光照射に基づいて単離する手法を確立した。この手法を確立し

たことで、将来的には本研究で開発した細胞分離手法が、表面マーカーや細胞生存率を指標として、特定の細胞を分離する用途に利用できる」と期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Tamura et al., Click-crosslinkable and photodegradable gelatin hydrogels for cytocompatible optical cell manipulation in natural environment, Scientific Reports, 5, pp. 15060, 2015.

田村 磨聖、杉浦 慎治、がんの多様性、生物工学会誌, 94-2, pp.82、2016.

[学会発表](計 11 件)

Shinji Sugiura, Microscale Cell Manipulation by Photodegradable Hydrogel, YABEC2014, Chiayi, Taiwan, 2014.

Tamura et al., Optical cell separation with photodegradable hydrogels from three-dimensional environment for pure culture techniques, PN&G 2014, Tokyo, Japan, 2014.

Tamura et al., Photodegradable hydrogels for optical cell separation from three-dimensional environment, 10th SPSJ International Polymer Conference (IPC 2014), 2014.

Tamura et al., Optical cell separation from 3D culture environment in photodegradable hydrogels for pure culture techniques, EMBS Micro and Nanotechnology in Medicine Conference, 2014.

Tamura et al., Micropatterned Three-Dimensional Culture in Click-Crosslinkable and Photodegradable Gelatin Hydrogels, 26th 2015 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nagoya, 2014.

Tamura et al., Development of an optical cell separation based on a cellular shape using click-crosslinkable and photodegradable gelatin hydrogels, The Eighth International Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology (MMB 2016), Seoul, 2016.

Shinji Sugiura, Optical cell manipulation using biomaterial-based photodegradable hydrogels, Fall Symposium 2016 of KICHe, Daejeon, 2016.

Tamura et al., Development of cellular morphology-based separation system for three-dimensional culture, AACR Annual Meeting 2016, New Orleans, Louisiana, 2016.

Tamura et al., Click-crosslinkable and photodegradable gelatin hydrogels for cell separation, ICBS2016, Tokyo, 2016

杉浦 慎治、光分解性ゲルを用いたがん細胞選抜システムの開発、CBI 学会 2017 年大会, 船堀、2017

杉浦 慎治他、ハイドロゲル包埋培養系から生きたまま細胞を選抜する自動細胞分離装置の開発、化学工学会第 49 回秋季大会, 名古屋大学、2017

[産業財産権]

出願状況(計 4 件)

名称: 光分解性架橋剤、光分解性ゲル、細胞培養器具、細胞配列・分別装置、細胞配列方法、細胞分別方法、組織体形成方法および組織体

発明者: 杉浦 慎治、高木俊之、柳川史樹、須丸公雄、金森敏幸

権利者: 産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: PCT/JP2014/062725 (W I P O)

出願年月日: 平成 26 年 5 月 13 日

国内外の別: 国際

名称: クリック架橋型光分解性ゲル

発明者: 杉浦 慎治、田村 磨聖、高木俊之、須丸公雄、金森敏幸

権利者: 産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特願 2015-077159

出願年月日: 平成 27 年 4 月 3 日

国内外の別: 外国

名称: 光分解性ゲル、細胞培養器具、細胞配列・分別装置、細胞配列方法および細胞分別方法

発明者: 杉浦 慎治、高木俊之、須丸公雄、金森敏幸

権利者: 産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: PCT/JP2016/057107

出願年月日: 平成 28 年 3 月 8 日

国内外の別: 外国

名称: 光分解性ハイドロゲル、培養器具、組織体形成方法及び細胞分離方法

発明者: 杉浦 慎治、田村 磨聖、高木俊之、須丸公雄、金森敏幸、柳川史樹

権利者: 産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: PCT/JP2016/061017

出願年月日: 平成 28 年 4 月 4 日

国内外の別： 外国

取得状況（計 1 件）

名称：光分解性架橋剤、光分解性ゲル、細胞培養器具、細胞配列・分別装置、細胞配列方法、細胞分別方法、組織体形成方法および組織体

発明者：杉浦慎治、高木俊之、柳川史樹、須丸公雄、金森敏幸

権利者：産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特 6056111

取得年月日：平成 28 年 12 月 16 日

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

URL:<https://staff.aist.go.jp/shinji.sugiura/index.htm>

6．研究組織

(1)研究代表者

杉浦 慎治（SUGIURA, Shinji）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・主任研究員

研究者番号：10399496